



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21), (22) Заявка: **2009119267/13**, **21.05.2009**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
21.05.2009(45) Опубликовано: **20.09.2010** Бюл. № **26**(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: **RU 2054442 C1**, **20.02.1996**. **RU 2240816**
C1, **27.11.2004**. **JP 2007-217339 A**, **30.08.2007**.

Адрес для переписки:

690022, г. Владивосток, пр-т 100-лет
Владивостоку, 159, Тихоокеанский институт
биоорганической химии ДВО РАН, зав.
патентным отделом Н.И. Стадниченко

(72) Автор(ы):

Герасименко Наталья Ивановна (RU),
Бусарова Наталья Германовна (RU),
Козловская Эмма Павловна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

ТИХООКЕАНСКИЙ ИНСТИТУТ
БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ТИБОХ ДВО РАН) (RU)

(54) СПОСОБ ПЕРЕРАБОТКИ БУРЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ

(57) Реферат:

Изобретение относится к технологии переработки бурых водорослей. Водоросли заливают 96% этиловым спиртом и выдерживают при комнатной температуре в течение 5-7 мин с получением экстракта I. Далее водоросль трижды экстрагируют 96% этиловым спиртом в течение 10-15 мин при комнатной температуре с получением экстрактов II-IV. Каждый из экстрактов I-IV концентрируют до небольшого объема. Затем к каждому концентрату дважды добавляют гексановый растворитель и воду и оставляют смесь для разделения на водно-спиртовую и гексановую фазы. Гексановые фазы объединяют и концентрируют с получением хлорофиллов. Водно-спиртовые фазы объединяют и добавляют хлороформ и воду.

Смесь перемешивают и оставляют для разделения на две фазы. Далее отбирают нижнюю хлороформную фазу, промывают ее дважды водой и концентрируют с получением фукоксантина. Остаток водоросли I настаивают в смеси растворителей ацетон - спирт в соотношении 1:1 в течение суток. Экстракт концентрируют, растворяют в хлороформе и отмывают дважды водой с получением концентрата глицерогликолипидов остатка водоросли II. Остаток водоросли II высушивают и используют для получения солей альгиновых кислот. Изобретение позволяет получать из одного сырья разные биологически активные вещества высокой степени чистоты: фукоксантин, хлорофиллы, глицерогликолипиды, соли альгиновых кислот с высокими выходами. 1 з.п. ф-лы.

RU
2
3
9
9
2
9
8
C
1

RU
2
3
9
9
2
9
8
C
1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION(21), (22) Application: **2009119267/13, 21.05.2009**(24) Effective date for property rights:
21.05.2009(45) Date of publication: **20.09.2010 Bull. 26**

Mail address:

**690022, g.Vladivostok, pr-t 100-let Vladivostoku,
159, Tikhookeanskij institut bioorganicheskoj
khimii DVO RAN, zav. patentnym otdelom N.I.
Stadnichenko**

(72) Inventor(s):

**Gerasimenko Natal'ja Ivanovna (RU),
Busarova Natal'ja Germanovna (RU),
Kozlovskaja Ehmma Pavlovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**TIKHOKEANSKIY INSTITUT
BIOORGANICHESKOJ KhIMII
DAL'NEVOSTOCHNOGO OTDELENIJa
ROSSIJSKOJ AKADEMII NAUK (TIBOKh
DVO RAN) (RU)**

(54) METHOD OF PROCESSING BROWN ALGAE

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to the technology of processing brown algae. Algae is sluiced with 96% ethanol and held at room temperature for 5-7 minutes to obtain an extract I. Further, the algae are thrice extracted with 96% ethanol for 10-15 minutes at room temperature to obtain extracts II-IV. Each of the extracts I-IV is concentrated to a small volume. Hexane solvent and water are twice added to each concentrate and the mixture is left to separate the water-alcohol and hexane phases. Hexane phases are combined and concentrated to obtain chlorophylls. The water-alcohol phases are combined and chloroform and water are added. The mixture is stirred and left for separation into two phases.

Further, the lower chloroform phase is separated and washed twice with water and concentrated to obtain fucoxanthin. Residue of algae I is infused into a mixture of solvents acetone-alcohol in ratio of 1:1 for a day. The extract is concentrated, dissolved in chloroform and washed twice with water to obtain an extract of glyceroglycolipids of algae II residue. The algae II residue is dried and used to obtain salts of alginic acids.

EFFECT: invention enables to obtain highly pure different biologically active substances from one raw material: fucoxanthin, chlorophylls, glyceroglycolipids, salts of alginic acids with high output.

2 cl, 5 ex

Изобретение относится к технологии переработки бурых водорослей с получением из них разных по химической природе биологически активных веществ высокой степени чистоты: фукоксантина, а также хлорофиллов, глицерогликолипидов, альгинатов

5 Дальневосточные моря богаты промысловыми видами бурых водорослей. Среди них ламинариевые водоросли, безусловно, важная по экономической значимости группа морских водорослей. Основные ресурсы ламинарий находятся у Курильской
10 гряды, где известно более 50 видов ламинарий и где формируется около половины мировых запасов. Ощутимые запасы этих водорослей наблюдаются и в Японском море. К массовым видам бурых водорослей Камчатского побережья относятся также аляриевые и фукусовые водоросли. Высокая общая биомасса этих водорослей делает их перспективными объектами для промышленного использования. Водоросли
15 содержат разнообразные биологически активные вещества, которые эффективны при терапии и профилактике широкого спектра заболеваний, а также используются в пищевой, косметической и других отраслях промышленности. Это делает актуальной задачу комплексной переработки водорослевого сырья. В настоящее время
20 разработано большое количество технологий комплексной переработки бурых водорослей с получением разных типов полисахаридов, лечебно-профилактических продуктов и биологически активных веществ.

Бурые водоросли обязаны своим названием присутствующему в них пигменту фукоксантину. Различные соотношения его с хлорофиллами и каротиноидами
25 придают бурым водорослям различные оттенки желто-зелено-бурого цветов. Фукоксантин составляет более 10% всех каротиноидов в природе и обладает рядом биологических активностей, включающих антиоксидантную [JP 7224278, 22.08.1995],
30 противоопухолевую [JP 10158156, 16.06.1998]. В последние годы появилось множество работ, указывающих на профилактическое действие фукоксантина бурых водорослей против рака [Okuzumi J. et al. Cancer Lett. 1993, 68, 159-168; Sugawara T., et al. J. Agric.
Food Chem. 2006, 54, 26, 9805-9810; Hosokawa M. et al. Bio-functions of marine carotenoids. Foods Sci. Biotechnol. 2009. V.18. P.1-11]. В представленных работах показано, что
35 фукоксантин понижает жизнеспособность раковых клеток простаты индуцированием апоптоза в большей степени, чем другие каротиноиды. Отдельные исследования показали, что фукоксантин понижает уровень экспрессии антиапоптозного белка. Из
бурых водорослей выделен также метаболит фукоксантина - фукоксантинол, который имеет более выраженное антипролиферативное действие на клетки простаты рака, чем
40 фукоксантин. Фукоксантин и/или фукоксантинол входят в состав композиций, применяемых для ингибирования прорастания кровеносных сосудов [JP 2008001623 (A), 10.01.2008]. Фукоксантин или фукоксантинол используют в качестве
терапевтического агента для лечения и профилактики злокачественных образований, связанных с вирусами [US 200801525, 17.01.2008].

Фукоксантин, экстрагированный из бурых водорослей, в частности из ундарии
45 перистой *Undaria pinnatifida*, эффективен в профилактике и лечении рака печени. Выпускается в виде инъекций внутривенных, подкожных, для приема через рот, кишку и в виде суппозиторий. Доза 1 мг - 10 г в зависимости от возраста. Отдельные
исследования показали противовоспалительное действие фукоксантина и его
50 способность защищать организм от ожирения [Maeda H., et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005, 332, 392-397; CA 2609454 (A1), 30.11.2006.]. Диета фукоксантином в количестве 0,6 ммоль/день или 5,5 г водоросли в день оказывает профилактическое действие против раковых заболеваний и позволяет бороться с ожирением.

Фукоксантин обладает антиангиогенной активностью и может быть использован для профилактики ангиогензависимых болезней [Sugawara T., et al. J.Agric. Food Chem. 2006, 54, 26, 9805-9810].

5 Хлорофиллы - зеленые пигменты фотосинтетических организмов, с помощью которых они улавливают энергию солнечного света и осуществляют фотосинтез. Строение молекулы хлорофилла имеет сходства со строением молекулы гемоглобина - основного дыхательного пигмента крови человека. Единственное отличие заключается в том, что в центре хелатного комплекса в хлорофилле находится атом
10 магния, а в гемоглобине - железо. Поэтому хлорофилл способен оказывать на кровь воздействие, сходное с действием гемоглобина. В последние годы производные хлорофилла, фукоксантина, а также каротина привлекают пристальное внимание медиков в плане получения кроветворных, антимикробных, иммуностимулирующих и дезодорирующих средств. Из ламинарии создан препарат «ламивит» широкого
15 спектра действия, включающий хлорофилл. Он является кроветворным средством, используется в качестве адаптогена [RU 2183127, 10.06.2002]. Препараты на основе хлорофилла используются при лечении лучевых ректитов [RU 2034541, 10.05.1995].

Пристальное внимание в последние годы уделяют глицерогликолипидам, главным
20 компонентам фотосинтетических мембран водорослей. Глицерогликолипиды являются основным источником полиненасыщенных жирных кислот и проявляют широкий ряд биологических активностей: они активны против опухолевых клеток, в частности, против клеток аденокарциномы прямой кишки человека и лейкемии
25 мышей [Juing J.H. et al., Phytochem. 1996. V.42. P.447-452], проявляют антимитотическую активность против рака груди и клеток рака кишечника [Williams D.E. et al., J. Am. Chem. Soc. 2007. V.129. P.5822-5823], ингибируют рост патогенных бактерий у наземных растений [Andersson M.Xet. et al.et J. Biol.Chem. 2006. V.281. P.31528-31537].

Наибольший интерес представляют следующие способы переработки водорослей,
30 близкие к заявляемому способу.

Известен способ получения фукоксантина, включающий экстрагирование
измельченных водорослей водным раствором спирта, насыщенным хлоридом калия, обработку экстракта ацетоном для осаждения примесей, перевод фукоксантина в слой
35 диэтилового эфира и промывание его водой [RU 2054442, 20.02.1996]. По мнению авторов, получаемый фукоксантин имеет такую же степень чистоты, как после хроматографической очистки.

Однако способ не позволяет отделить нейтральные и полярные липиды водорослей
40 от фукоксантина и выделить хроматографически чистый фукоксантин, т.к. только часть полярных липидов может быть отделена ацетоном, а в диэтиловый эфир совместно с фукоксантином перейдут нейтральные липиды и стерины.

Известен способ получения фукоксантина, включающий экстракцию фукоксантина
из бурой водоросли метанолом и дихлорметаном, с последующей очисткой
45 фукоксантина высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) [Jung S.T. et al. KR 20040047486 (A) 05.06.2004]. Очищенный фукоксантин в дихлорметане подвергают действию озона или сухого льда, а затем колоночной хроматографии на силикагеле и обращеннофазной ВЭЖХ для получения метаболитов фукоксантина.

Однако способ выделения фукоксантина требует применения ВЭЖХ и в
50 производстве не применим.

Известен способ выделения фукоксантина из ризоидов бурой водоросли *Laminaria japonica* Agesch, включающий экстракцию фукоксантина из сырья диметилсульфоксидом (ДМСО), выделение фукоксантина из ДМСО - экстракта

этилацетатом в присутствие сульфата аммония, который способствует быстрому и полному переходу пигментов из ДМСО в этилацетат [Wang W.J., et al., J.Integrative Plant Biology. 2005. V.47. P.1009-1015]. Выход фукоксантина составляет 88% от содержания фукоксантина в сырье, чистота продукта 63%. Расход ДМСО в пересчете на 1 г сырья составляет порядка 4 мл.

Однако способ, несмотря на эффективность выделения продукта при применении ДМСО, не позволяет получить продукт более высокой степени чистоты.

Известен способ получения фукоксантина, включающий обработку водорослей горячей водой для разрушения хлорофилла, экстракцию из обработанного сырья органическим растворителем жирорастворимого масла и выделение фукоксантина из масла колоночной хроматографией на силикагеле [WO 2007049786 (A1), 03.05.2007].

Однако способ не позволяет получить наряду с фукоксантином хлорофиллы и глицерогликолипиды.

В качестве прототипа выбран способ получения фукоксантина из ламинарии *Laminaria japonica*, содержащей высокое количество фукоксантина - порядка 21,3-17,8 мг/100 г сырой водоросли [Kanazawa K., et al., Food Science Technol. Res. 2008. V.14. P.573-582]. Способ включает промывание замороженных водорослей водопроводной водой для понижения содержания соли, разрезание водорослей на мелкие кусочки (до 5 мм) и двукратное экстрагирование сырья 3 объемами абсолютного этанола при нагревании. Для удаления хлорофиллов экстракт очищают колоночной хроматографией на силикагеле. Способ позволяет получить из 10 тонн сырья 1490 г фукоксантина, что составляет порядка 82% от его содержания в сырье.

Однако способ требует энергозатрат, т.к. экстракция сырья проводится при нагревании и не позволяет получить другие ценные вещества из сырья такие, как хлорофиллы и глицерогликолипиды.

Способов переработки бурых водорослей с получением из них в первую очередь фукоксантина, а также хлорофиллов и глицерогликолипидов, в доступной патентной и другой научно-технической литературе не обнаружено.

Технический результат, обеспечиваемый изобретением, заключается в расширении спектра биологически активных веществ, получаемых из одного и того же вида водоросли, а также в получении препаратов с высокой степенью чистоты и с высоким выходом. Заявляемый способ направлен, в первую очередь, на выделение фукоксантина, а также позволяет получить хлорофиллы, глицерогликолипиды. Кроме того, после проведения всех процедур выделения выше перечисленных продуктов, получают обезжиренную крупку водоросли, которую подвергают дальнейшей переработке для получения полисахаридов (альгинатов).

Технический результат достигается заявляемым способом переработки бурых водорослей, в котором сырье заливают 96% этиловым спиртом, выдерживают при комнатной температуре в течение 5-7 мин с получением экстракта I. Далее водоросль трижды экстрагируют 96% этиловым спиртом в течение 10-15 мин при комнатной температуре с получением экстрактов II-IV. Каждый из экстрактов I-IV концентрируют до небольшого объема. После этого к каждому концентрату добавляют гексановый растворитель и воду, и оставляют смесь для разделения на водно-спиртовую и гексановую фазы. Процедуру извлечения гексановым растворителем для каждого концентрата повторяют дважды. Далее гексановые фазы объединяют и концентрируют с получением хлорофиллов. Водно-спиртовые фазы объединяют и добавляют хлороформ и воду. Смесь перемешивают и оставляют для разделения на две фазы. Далее отбирают нижнюю хлороформную фазу,

дополнительно промывают ее дважды водой и концентрируют с получением фукоксантина. Остаток водоросли I подвергают настаиванию в смеси растворителей ацетон - спирт в соотношении 1:1 в течение суток. Экстракт концентрируют, растворяют в хлороформе и отмывают дважды водой с получением концентрата глицерогликолипидов и остатка водоросли II.

Получение натриевых солей альгиновых кислот производят по известной методике из остатка водоросли II, высушенной на воздухе досуха для удаления ацетона и спирта [RU 2008107376]. Остаток водоросли дважды экстрагируют при температуре 65°C 1% водным раствором гидрокарбоната натрия в течение 3-х часов для получения водных растворов (1 и 2) натриевой соли альгиновой кислоты. После этого каждый из полученных растворов нейтрализуют до pH 7 и проводят осаждение продукта этиловым спиртом. Образующиеся в этиловом спирте хлопья солей альгиновой кислоты отфильтровывают через мелкоячеистую капроновую ткань. Полученный полупродукт еще дважды растворяют в 96% этиловом спирте, освобождают от спирта фильтрованием через мелкоячеистую ткань, высушивают до постоянного веса.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами конкретного выполнения.

Пример 1. 300 г ламинарии (*Laminaria sichorioides*) измельчают и заливают 1 л 96% этилового спирта, выдерживают в течение 6 мин. Экстракт I сливают в приемную емкость, а водоросль повторно заливают 96% этиловым спиртом и выдерживают 12 мин при комнатной температуре (экстракт II). Последнюю процедуру проводят еще дважды (получают экстракты III и IV). Каждый из 4 экстрактов концентрируют до объема 100 мл. Добавляют 150 мл гексана и воду (20 мл) для расслоения смеси на две фазы - водно-спиртовую и гексановую. Процедуру извлечения гексаном повторяют еще дважды. Гексановые экстракты, содержащие хлорофиллы, объединяют и концентрируют.

Спиртовые экстракты I-IV, очищенные гексаном и содержащие фукоксантин, объединяют (общий объем экстракта порядка 500 мл) и очищают от солей, маннита, низкомолекулярных углеводов и других органических примесей добавлением 1 л хлороформа и 0,5 л воды. Смесь перемешивают и оставляют для разделения на две фазы. Отбирают нижнюю хлороформную фазу, ее дополнительно промывают дважды водой (по 0,5 л) и концентрируют с получением фукоксантина (чистота продукта 95%). Выход продукта составляет порядка 0,7 г или 230 мг/100 г сырой водоросли.

Остаток водоросли I после 4-х экстракций этиловым спиртом экстрагируют в течение суток настаиванием с 1 л смеси растворителей ацетон - спирт в соотношении 1:1 (объемные соотношения). Экстракт концентрируют, растворяют в 100 мл хлороформа и отмывают дважды дистиллированной водой (по 50 мл) от остаточных солей. Получают концентрат глицерогликолипидов (чистота продукта 87%, примесь составляют хлорофиллы) и остаток водоросли II. Выход продукта составляет 0,45 г или 150 мг/100 г сырой водоросли.

Получение натриевых солей альгиновых кислот. Остаток водоросли II высушивают на воздухе досуха для удаления остатков ацетона и спирта, заливают 300 мл 1% водного раствора гидрокарбоната натрия, нагревают в течение 3 часов при температуре 65°C для получения водного раствора натриевой соли альгиновой кислоты. После слива раствора 1 остаток водоросли повторно экстрагируют таким же раствором с получением раствора 2.

300 мл водного раствора 1 нейтрализуют до pH 7 и выливают в 1,5 л этилового спирта. Образовавшиеся хлопья солей альгиновой кислоты отфильтровывают через мелкоячеистую капроновую ткань. Полупродукт с фильтра повторно растворяют

в 0,3 л 96% этилового спирта, размешивают и фильтруют через мелкоячеистую ткань, высушивают до постоянного веса. Выход солей альгиновых кислот из раствора 1 составляет 6,86 г. Аналогичную процедуру проводят с раствором 2. Выход солей альгиновых кислот из раствора 2 составляет 6,55 г.

5 Пример 2. Алярию (*Alaria fistulosa*) подвергают процедурам, описанным в примере 1. Выход целевых продуктов составляет: фукоксантин - 350 мг/100 г сырой водоросли (чистота продукта порядка 93%, присутствуют триацилглицерины и свободный стерин), хлорофиллы - 240 мг/100 г сырой водоросли,
10 глицерогликолипиды - 400 мг/100 г сырой водоросли. Получение солей альгиновых кислот проводят, как в примере 1. Выход альгиновой кислоты из 100 г сырой водоросли из раствора 1 - 0,2 г, из раствора 2 - 0,44 г.

15 Пример 3. Фукус (*Fucus evanescens*) подвергают процедурам, описанным в примере 1. Выход целевых продуктов составляет: фукоксантин - 25 мг/100 г сырой водоросли (чистота продукта порядка 9%, присутствуют триацилглицерины и свободный стерин), хлорофиллы - 185 мг/100 г сырой водоросли,
20 глицерогликолипиды - 42 мг/100 г сырой водоросли. Получение солей альгиновых кислот проводят, как в примере 1. Выход альгиновой кислоты из 100 г сырой водоросли из раствора 1 - 1,6 г, из раствора 2 - 0,5 г.

25 Пример 4. Алярию или ламинарию или фукус подвергают процедурам, описанным в примере 1. Однако экстракцию водорослей проводят дважды при нагревании до 50°C в реакторе с водяной рубашкой последовательно в течение 10 мин и 30 мин. Спиртовые экстракты после концентрирования подвергают процедурам, описанным в
30 примере 1. Экстракция при нагревании приводит к более интенсивной экстракции в спиртовые экстракты хлорофиллов, фукоксантина, триацилглицеринов, свободных стеринов и глицерогликолипидов. Однако целевые продукты получают с более низкой степенью чистоты (50-60%).

35 Пример 5. Водоросль подвергают процедурам, описанным в примере 1, однако экстракцию проводят дважды 96% этиловым спиртом сначала в течение 1 часа и далее в течение суток при комнатной температуре. Получаемые спиртовые экстракты при такой экстракции обогащены хлорофиллами, свободными стеринами, фукоксантином, триацилглицеринами, небольшими примесями глицерогликолипидов. Целевые продукты получают с более низкой степенью чистоты (40-50%).

Формула изобретения

40 1. Способ переработки бурых водорослей, заключающийся в том, что сырье заливают 96% этиловым спиртом, выдерживают при комнатной температуре в течение 5-7 мин с получением экстракта I, затем водоросль трижды экстрагируют 96% этиловым спиртом в течение 10-15 мин при комнатной температуре с получением экстрактов II-IV, затем каждый из экстрактов I-IV концентрируют до небольшого объема, далее к каждому концентрату дважды добавляют гексановый растворитель и
45 воду, затем разделяют водно-спиртовую и гексановую фазы, далее гексановые фазы объединяют и концентрируют с получением хлорофиллов; затем водно-спиртовые фазы объединяют и добавляют хлороформ и воду, смесь перемешивают и оставляют для разделения на две фазы, далее отбирают нижнюю хлороформную фазу,
50 дополнительно промывают дважды водой и концентрируют с получением фукоксантина; затем остаток водоросли I подвергают настаиванию в смеси растворителей ацетон-спирт в соотношении 1:1 в течение суток, далее экстракт концентрируют, растворяют в хлороформе и отмывают дважды водой с получением

концентрата глицерогликолипидов и остатка водоросли II.

2. Способ по п.1, в котором остаток водоросли II сушат и используют для получения солей альгиновых кислот.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50